

DK/EP

Oversættelse vedr. EP patentansøgning / EP patent

Trykningsgebyr:

Ansøgers/fuldmægtigs referencenr.:

1.700,00

3776.205-EP

Ansøger (fulde navn og adresse):

NOVOZYMES A/S
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd
Danmark

Flere ansøgere på side 2

Fuldmægtig (navn og adresse):

Dansk benævnelse:

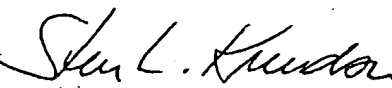
Anvendelse af lipase og alfa-amylase og/eller
xylanase til bagning

Bilagsfortegnelse:

- Dansk oversættelse af krav (T1) i 2 ekspl.
 Rettet dansk oversættelse af krav (T2) i 2 ekspl.
 Dansk oversættelse af patent (T3)
 Dansk oversættelse af ændret patent (T4)
 Rettet dansk oversættelse af patent (T5)
 Tegning
 Fuldmagt
X Brev vedr. trykningsgebyr

Dato og underskrift: 14 juni 2001

Sten Lottrup Knudsen
Novozymes A/S



EP ansøgningsnummer: 93919029.4

EP publiceringsnummer:

EP patentnummer: 0 659 049

Patentdirektoratet

Helgesøj Allé 81
DK-2630 Taastrup
Telefon 43 71 71 71
Telefax 43 71 71 70
Telex 16046 DPO DK
Postgiro 4 020553



jun92/s/PR

BEST AVAILARI E CORN

BEST AVAILARI E CORN

31 -

NZAS-0003534

Patent- og Varemærkestyrelsen
Helgeshøj Allé 81
2630 Tåstrup

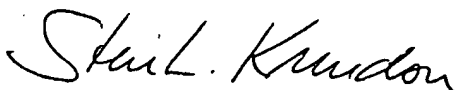
14 juni 2001

Deres ref: DK/EP 659049
Vor ref: 3776.205-EP

DK/EP oversættelse vedrørende EP patent 659 049
Trykningsgebyr

Vi skal hermed anmode om at trykningsgebyret (DKK 1700,00 trækkes på kontonr. PDK 1.

Med venlig hilsen
Novozymes A/S



Sten Lottrup Knudsen
Patents

NZAS-0003535

Anvendelse af lipase og α -amylase og/eller xylanase
til bagning

Opfindelsens område

Den foreliggende opfindelse angår en fremgangsmåde til fremstilling af en dej og/eller et bageriprodukt fremstillet ud fra dej ved anvendelse af enzymer. Endvidere angår opfindelsen en dej og en forblanding til en dej, som omfatter disse enzymer. Endelig angår opfindelsen anvendelsen af et enzympræparat ved en fremgangsmåde til fremstilling af en dej og/eller et bageriprodukt fremstillet ud fra dejen.

Opfindelsens baggrund

Inden for brødfremstillingsprocessen hører det til den kendte teknik at tilsætte til brøddejen brødforbedrende additiver og/eller dejkonditioneringsmidler, hvis virkning bla. resulterer i, at brødet får forbedret tekstur, volumen, smag og friskhed, samt at dejen bedre lader sig maskinforarbejde.

I de senere år har enzymer vist sig at være anvendelige som dejkonditioneringsmidler og/eller brødforbedrende midler, i særdeleshed enzymer såsom amylaser og proteaser, som indvirker på bestanddele, der er til stede i store mængder i dejen.

Lipase (EC 3.1.1.3) er et enzym tilhørende glycerolesterhydrolaserne, som katalyserer hydrolyse af esterbindinger i triglycerider. Det er blevet foreslået at anvende lipaser ved fremstilling af brød for at gøre brødets tekstur glattere og dermed bedre; men det har vist sig, at når lipase anvendes alene, forringes andre af brødets egenskaber, såsom brødets volumen, krummens elasticitet og mundfornemmelsen (JP-A 62-285 749). Anvendelse af lipase i bageindustrien er faktisk blevet anført som uønsket (Gams, 1976).

I JP-A 62-285 749 beskrives en fremgangsmåde til fremstilling af brød, hvorved lipase tilsættes til dej i samblanding med vitalgluten og lecithin. Når vitalgluten og lecithin tilsættes, anføres det, at lipasens uønskede virkninger undgås eller mindskes.

I EP 468 731 beskrives anvendelsen af et brødforbedrende middel, som omfatter enzymet glucoseoxidase, eventuelt i kombination med andre enzymer såsom hydrolaser. Lipase nævnes som ét eksempel på en sådan hydrolase.

I begge ovennævnte referencer beskrives prøvebagninger, hvor lipase tilsættes alene uden tilsætning af noget som helst af de øvrige forbedringsmidler, der beskrives i disse referencer. Disse prøvebagninger tjener det formål at illustrere de utilfredsstillende resultater, der opnås ved anvendelse af lipase alene i sammenligning med de resultater, der opnås, når lipase anvendes i samblanding med de øvrige forbedrende midler, der beskrives i disse referencer. I EP 468 731 er lipasen, der er anvendt til disse afprøvninger, ikke specificeret, hvorimod lipasen, der er anvendt i JP-A 62-285 749 angives at være Talipase, tilsyneladende en lipase produceret af en art af slægten *Rhizopus*. I prøvebagningerne, der er beskrevet i JP-A 62-285 749, har lipasen været anvendt i en mængde, som svarer til mindst 2240 lipaseenheder (Lipase Units: LU) pr. kg mel.

I US patent nr. 3 368 903, Johnson et al., beskrives fremgangsmåder til forsinkelse af brødets tilbøjelighed til at blive ufriskt, omfattende tilsætning af et lipasepræparat til en brøddejblanding. Den anvendte lipase er frembragt fra en plante eller stammer fra en svamp, dvs. fra en stamme af *Candida cylindracea*.

I JP-A-4 158 731, Fukuhara et al., beskrives et forbedrende middel til hævet frossen dej indeholdende en

lipase af uspecificeret oprindelse og en brødfremstillingsproces, som gør brug af hævet frossen dej, kendetegnet ved tilsætning af den nævnte lipase til brødbestanddelene.

5

Beskrivelse af opfindelsen

Det var derfor overraskende at finde, at anvendelsen af lipase i kombination med en α -amylase og/eller en xylanase, som defineret i kravene, under egnede betingelser kan resultere i væsentlige forbedringer af dej samt af bageriprodukter fremstillet ud fra dejen. Det var især overraskende at finde, at nogle af de egenskaber, som i nogle af de ovenfor citerede referencer blev angivet at blive forringet ved anvendelse af lipase (såsom brødvolumen), faktisk kunne forbedres. Den foreliggende opfindelse er baseret på dette fund.

10

15

Følgelig angår opfindelsen i et første aspekt en fremgangsmåde til fremstilling af en dej og/eller et bageriprodukt fremstillet ud fra dej ved at tilsætte enzymer, som defineret i kravene, til dejen og/eller til en hvilken som helst af dejens bestanddele og/eller til en hvilken som helst blanding af dejens bestanddele. Lipaseenhederne er yderligere defineret i nedenstående afsnit om materialer og metoder.

20

25

Det har vist sig, at lipase også udøver en fordelagtig virkning i dej uden tilsat fedt eller dej indeholdende kun små mængder tilsat fedt. Følgelig kan dejen være fedtfri.

30

Så vidt de foreliggende opfindere ved, er anvendelse af lipase ved fremstilling af dej og/eller bageriprodukter uden tilsat fedt eller indeholdende kun små mængder tilsat fedt attraktiv til fremstilling af kaloriefattig dej og/eller kaloriefattige bageriprodukter.

35

I den foreliggende kontekst skal udtrykket "fedt" angive et hvilket som helst fedtstof eller lipid, som kan anvendes ved fremstilling af dej og bageriprodukter. Fedtstoffer, som traditionelt anvendes til dette formål, indbefatter smør, margarine, bagefedt, olie og lignende, og kan være af vegetabilsk eller animalsk oprindelse eller af blandet vegetabilsk og animalsk oprindelse. Udtrykket "fedtfri" skal, sådan som det er anvendt her, angive, at dejen er i alt væsentligt fri for tilsat fedt.

I én bestemt udførelsesform omfatter dejen en tilsat fedtmængde, som udgør højst 3,5 vægt-% af den/de melbestanddel(e), som er til stede i dejen.

Udtrykket "forbedrede egenskaber", sådan som det er anvendt om den opnåede virkning på dejen og/eller bageriprodukterne fremstillet ud fra dej ifølge den foreliggende opfindelse, skal forstås i bred betydning, d.v.s. indbefattende en hvilken som helst egenskab, som kan forbedres ved lipasens indvirkning (i sammenligning med egenskaber, der opnås, når der ikke er blevet tilsat lipase).

I særdeleshed har det vist sig, at tilsætning af lipase, som defineret i kravene, resulterer i, at bageriproduktet får et øget volumen og en forbedret blødhed. Også en forbedret ældningshæmmende virkning opnås, dvs. bageriproduktets krumme bliver blødere, når der tilsættes lipase. Endvidere bliver farven på bageriproduktets krumme hvidere, når der tilsættes lipase til dejen. Ydermere har dej, som er fremstillet ved en fremgangsmåde ifølge opfindelsen, vist sig at opnå en forbedret konsistens, dvs. en øget blødhed og elasticitet, hvilket resulterer i en dej, som lettere lader sig maskinforarbejde. Dejens egnethed til maskinforarbejdning er en kritisk parameter, f.eks. ved industriel fremstilling af dej og bageriprodukter.

I yderligere aspekter angår den foreliggende opfindelse en dej eller en forblanding til en dej, som omfatter en lipase og en α -amylase og/eller en xylanase som defineret i kravene.

I et endeligt aspekt angår opfindelsen anvendelse af et enzympræparat ved en fremgangsmåde til fremstilling af dej og/eller bageriprodukter fremstillet ud fra dej, som defineret i kravene.

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

Det væsentligste triglyceridindhold i traditionel brøddej, som ikke indeholder tilsat fedt, findes i dejens melbestanddel(e) og udgør typisk ca. 1-3 vægt-% af dejen. Det forventes, at lipaseenzymet, som anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, er i stand til at nå frem til og indvirke på disse små mængder triglycerider, selv om frie vandmolekyler er så godt som fraværende i dejen.

Weegels og Hamer (1992), Bekes et al. (1992) og Bushyk et al. (1990) har rapporteret, at lipider, der er til stede i dej, interagerer med bestemte glutenkompleksproteiner, så der dannes lipid/gluten-aggregationer under dejfremstillingen.

Uden at være begrænset af nogen teori antages det umiddelbart, at lipase, der anvendes ifølge den foreliggende opfindelse, modificerer den i ovennævnte referencer rapporterede interaktion mellem lipid og glutenprotein og derved forbedrer dejens og bageriprodukternes egenskaber. Selv om beskaffenheden af interaktionen mellem lipid og gluten er ukendt, formodes det, at lipase reducerer en eventuel lipid/gluten-aggregation i dejen ved at udøve et begrænset angreb på aggregationernes lipidbestanddel, men uden at nedbryde

aggregationerne fuldstændigt. Denne modifikation af lipid/gluten-aggregationer antages at resultere i et forbedret glutenkompleks, og dermed en forbedret dejkonsistens, et større brødvolumen og en bedre krummestruktur i sammenligning med de egenskaber, der opnås, når der ikke tilsættes lipase.

Endvidere antages det, at lipase danner en "in situ"-emulgator omfattende mono- og diglycerider i dej, hvilken emulgator er ansvarlig for den forbedrede ældningshæmmende virkning, som er iagttaget ifølge opfindelsen.

Til fremstilling af dej og/eller bageriprodukter, som omfatter kun små mængder tilsat fedt, foretrækkes det, at mængden af tilsat fedt udgør højst 3 vægt-% af dejens melbestanddel(e), fortrinsvis højst 2,8 vægt-% af dejens melbestanddel(e), såsom højst 2,5 vægt-%, mere fortrinsvis højst 2,0 vægt-% af dejens melbestanddel(e), endnu mere fortrinsvis højst 1,5 vægt-%, stadig mere fortrinsvis højst 1,0 vægt-% og mest fortrinsvis højst 0,5 vægt-% af dejens melbestanddel(e).

Den mikrobielle lipase, som skal anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, er en lipase afledt fra en stamme af *Humicola* spp., i særdeleshed fra en stamme af *H. lanuginosa*. Et eksempel på en sådan lipase er *H. lanuginosa*-lipasen, der er beskrevet i EP 305 216.

Lipasen kan frembringes fra den pågældende mikroorganisme ved anvendelse af en hvilket som helst egnet teknik. For eksempel kan et lipasepræparat frembringes ved fermentering af en mikroorganisme og efterfølgende isolation ved en fremgangsmåde, som hører til den kendte teknik, men mere fortrinsvis ved anvendelse af rekombinant DNA-teknikker, som hører til den kendte teknik. En sådan fremgangsmåde omfatter normalt dyrkning af en værtselle omdannet med en rekombinant DNA-vektor, som er i stand til

at udtrykke og bære en DNA-sekvens, der koder for den pågældende lipase, i et dyrkningsmedium under betingelser, som muliggør ekspression af enzymet og udvinding af enzymet fra kulturen.

5

DNA-sekvensen, som koder for den lipase, der skal anvendes, kan være af en hvilken som helst oprindelse, f.eks. en cDNA-sekvens, en genomsekvens, en syntetisk sekvens eller en hvilken som helst kombination af disse.

10

Eksempler på egnede fremgangsmåder til fremstilling af mikrobielle lipaser er beskrevet i f.eks. EP 0 238 023 og EP 0 305 216.

15

Normalt tilsættes enzympræparatet, som skal anvendes i den foreliggende opfindelse, i en mængde, som i dejen resulterer i en lipaseaktivitet i området fra 10 til 50 000 LU/kg mel. En lipaseaktivitet på under 10 LU/kg mel antages ikke at tilvejebringe nogen væsentlig virkning, mens en lipaseaktivitet på over 100 000 LU/kg mel antages at resultere i en for stor modifikation af dejen, f.eks. en dej, som er for klæbrig.

20

Det foretrækkes, at lipasepræparatet tilsættes i en mængde, som i dejen resulterer i en lipaseaktivitet i området fra 10 til 3000 LU/kg mel, fra 10 til 2500 LU/kg mel, fra 10 til 2100 LU/kg mel eller fra 10 til 2000 LU/kg mel. Meget fordelagtige virkninger på dej og brød opnås, når der anvendes et lipasepræparat i en mængde svarende til en lipaseaktivitet i området fra 250 til 2100 LU/kg mel, såsom fra 500 til 2100 LU/kg mel eller fra 250 til 1500 LU/kg mel.

25

30

Enzympræparatet, som skal anvendes i den foreliggende opfindelse, kan med fordel anvendes i kombination med andre dejkonditioneringsmidler eller brødforbedrende midler.

35

Enzympræparatet, som skal anvendes ved en fremgangsmåde ifølge opfindelsen, kan ydermere omfatte en cellulase, en glucoseoxidase (anvendelig til styrkning af dejen), f.eks. en glucoseoxidase af svampeoprindelse såsom Novozym® 358 (en *A. niger*-glucoseoxidase), en protease (anvendelig til svækkelse af gluten, navnlig når der anvendes mel af hård hvede), f.eks. Neutrase®, en peroxidase (anvendelig til forbedring af dejens konsistens), en peptidase og/eller en maltogenase.

Således kan hvilke som helst andre bestanddele, som er til stede i enzympræparatet, være af en anden oprindelse end lipasen eller af samme oprindelse som denne. Alternativt kan én eller flere yderligere enzymaktiviteter tilsættes separat fra enzympræparatet, som omfatter lipasen.

De øvrige enzymer er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse og kan frembringes ved traditionelle teknikker anvendt inden for faget, som nævnt ovenfor.

En almindeligt iagttaget ulempe, når pentosanase anvendes til bagning, er, at dejen får en uønsket klæbrighed. Det har overraskende vist sig, at lipasen kan reducere eller undgå den nævnte klæbrighed. Følgelig anvendes lipasen i én udførelsesform for en fremgangsmåde ifølge opfindelsen med fordel i kombination med en xylanase. Xylanasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, f.eks. afledt fra en bakterie eller en svamp, såsom en stamme af *Aspergillus*, navnlig *A. aculeatus*, *A. niger* (jf. WO 91/19 782), *A. awamori* (WO 91/18 977) eller *A. tubigenensis* (WO 92/01 793), fra en stamme af *Trichoderma*, f.eks. *T. reesei*, eller fra en stamme af *Humicola*, f.eks. *H. insolens* (WO 92/17 573). Pentopan® og Novozym 384® (begge fra Novo Nordisk A/S) er kommercielt tilgængelige xylanasepræparater, som er produceret af *Trichoderma reesei*.

I en anden udførelsesform for en fremgangsmåde ifølge opfindelsen anvendes lipase med fordel i kombination med en α -amylase. α -amylasen er fortrinsvis af mikrobiel oprindelse, f.eks. afledt fra en bakterie eller en svamp, såsom en stamme af *Aspergillus*, i særdeleshed *A. niger* eller *A. oryzae*, eller en stamme af *Bacillus*. Kommercielt tilgængelige α -amylaser, der er egnet til det foreliggende formål, er Fungamyl® (en *A. oryzae* α -amylase), Novamyl® (en *B. stearrowthermophilus* α -amylase, jf. EP 120 693) og BAN® (en *B. amyloliquefaciens* α -amylase), som alle kan købes hos Novo Nordisk A/S.

Lipasen anvendes i kombination med et andet enzym, hvor doseringen af lipasen er 10-50 000 LU/kg mel. De øvrige enzymaktiviteter kan doseres ifølge almindelig bagepraksis. I denne henseende er en foretrukken dosering af xylanase 5-5000 FXU/kg mel, og en foretrukken dosering af amylase er 5-500 FAU/kg mel.

Xylanaseaktiviteten FXU (Farbe-Xylanase-Units) og α -amylaseaktiviteten FAU kan bestemmes ved hjælp af den procedure, som er anført i nedenstående afsnit om materialer og metoder.

Foruden de ovennævnte yderligere enzymaktiviteter kan et mikrobielt produceret lipasepræparat indeholde varierende små mængder af andre enzymatiske aktiviteter, som produceres naturligt af den pågældende producerende organisme.

Enzympræparatet, som skal anvendes ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan være i en hvilken som helst form, der er egnet til den pågældende anvendelse, f.eks. i form af et tørt pulver eller granulat, i særdeleshed et støvfrit granulat, en væske, i særdeleshed en stabiliseret væske, eller et beskyttet enzym. Granulater kan fremstilles f.eks. som beskrevet i US 4 106 991 og

US 4 661 452 og kan eventuelt overtrækkes ved hjælp af fremgangsmåder, som hører til den kendte teknik. Væskeformige enzympræparater kan for eksempel stabiliseres ved tilsætning af ernæringsmæssigt acceptable stabilisatorer såsom sukker, en sukkeralkohol eller en anden polyol, mælkesyre eller en anden organisk syre ifølge anerkendte fremgangsmåder. Beskyttede enzymer kan fremstilles ifølge den i EP 238 216 beskrevne fremgangsmåde.

Til indbefatning i forblandinger eller mel er det normalt fordelagtigt, at enzympræparatet er i form af et tørt produkt, f.eks. et støvfrit granulat, hvorimod det til indbefatning sammen med en væske er fordelagtigt, at det er i væskeform.

Som nævnt ovenfor antages lipasen at danne en *in situ*-emulgator, og i én udførelsesform formodes den således at tjene som erstatning for emulgatorer, som normalt anvendes til forbedring af dejens strækbarhed og i en vis udstrækning til forbedring af brødets konsistens (gør det lettere at skære i skiver) samt til forbedring af brødets opbevaringsstabilitet.

Lipasepræparatet kan imidlertid også anvendes sammen med traditionelle emulgatorer, så der opnås en bedre forbedrende virkning, som ikke kan opnås ved at anvende én eller to emulgatorer alene. Eksempler på sådanne emulgatorer er mono- eller diglycerider, f.eks. DATEM og SSL, diacetylvinsyreestere af mono- og diglycerider, sukkerestere af fedtsyrer, polyglycerolestere af fedtsyrer, mælkesyreestere af monoglycerider, eddikesyre- eller citronsyreestere af monoglycerider, polyoxyethylenstearater, phospholipider og (til fremstilling af dej med lavt fedtindhold) lecithin.

Enzympræparatet kan tilsættes, som det er, til blandingen, af hvilken dejen fremstilles, eller det kan alternativt tilsættes som en bestanddel af et dejkonditioneringsmiddel og/eller en brødforbedrende sammensætning. Dejkonditioneringsmidlet og/eller den brødforbedrende sammensætning kan være en hvilken som helst almindeligt anvendt sammensætning, f.eks. omfattende én eller flere af følgende bestanddele:

Et mælkepulver (til at give skorpen farve), en emulgator (såsom ovennævnte), granuleret fedtstof (til blødgøring af dejen og brødet konsistens) og oxidant (tilsættes for at forstærke glutenstrukturen; f.eks. ascorbinsyre, kaliumbromat, kaliumiodat eller ammoniumpersulfat), en aminosyre (f.eks. cystein), et sukker, salt (f.eks. natriumchlorid, calciumacetat, natriumsulfat eller calciumsulfat, som tjener til at gøre dejen fastere) og (til fremstilling af dej med lavt fedtindhold) gluten (til at forbedre svage meltypers evne til gastilbageholdelse).

Typisk tilsættes dejkonditioneringsmidlet og/eller den brødforbedrende sammensætning i en mængde svarende til ca. 1-5 %, såsom 1-3 % af det tilsatte mel.

Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse formodes at kunne anvendes til forbedring af en hvilken som helst dejtypes egnethed til maskinforarbejdning. Den forbedrede egnethed til maskinforarbejdning er selvfølgelig særligt vigtig til dejtyper, som skal forarbejdes industrielt, og et eksempel herpå er dejtyper, som skal ekstruderes (f.eks. til fremstilling af kiks eller knækbrødstyper). Anvendelsen af lipase i sådanne typer brød antages ikke at have nogen indflydelse på det resulterende produkts tekstur, hvilket vil sige, at der ikke frembringes nogen uønsket blødgøring af produkter, som skal være sprøde. Endvidere anses anvendelsen af lipase ikke at have nogen

negativ indflydelse på de resulterende bageriprodukters smag, men forventes snarere at forbedre smagen.

5 Udtrykket "bageriprodukt", sådan som det er angivet ovenfor, skal indbefatte et hvilket som helst produkt fremstillet ud fra dej. Bageriproduktet kan være hævet med gær eller kemiske midler og kan være af blød eller sprød beskaffenhed. Eksempler på bageriprodukter, hvad enten de er af en hvid, lys eller mørk type, og som med fordel kan 10 fremstilles ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse, er brød, typisk i form af brød eller boller, fransk brød af baguettetypen, pitabrød, tacobrød, kager, pandekager, kiks, knækbrød og lignende.

15 Dejen og/eller bageriproduktet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen er normalt baseret på groft eller fint hvedemel, eventuelt i kombination med andre typer groft eller fint mel, såsom majsmel, groft rugmel, fint rugmel, fint eller groft havremel, sojamel, 20 groft eller fint sorghummel eller groft eller fint kartoffelmel. Det formodes imidlertid, at fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse vil fungere lige godt ved fremstilling af dej og bageriprodukter, der er primært baseret på andre typer groft eller fint mel, såsom groft 25 eller fint majsmel, groft eller fint rugmel eller hvilke som helst andre typer, såsom ovennævnte typer groft eller fint mel.

30 Som nævnt ovenfor tilsættes lipasepræparatet til en hvilken som helst blanding af dejbestanddele, til dejen eller til hvilke som helst af de bestanddele, der skal indbefattes i dejen; med andre ord kan lipasepræparatet tilsættes på et hvilket som helst trin i dejfremstillingen og kan tilsættes på ét, to eller flere trin, hvor det er 35 passende. Imidlertid bør lipasen ikke tilsættes sammen med noget som helst stærkt kemikalie eller under forhold, hvor enzymet inaktiveres.

Håndteringen af dejen og/eller bagningen foretages på en hvilken som helst måde, der er egnet til den pågældende dej og/eller det pågældende bageriprodukt, typisk indbefattende trinnene, hvor dejen æltes, dejen 5 underkastes én eller flere hævebehandlinger, og produktet bages under egnede betingelser, dvs. ved en egnet temperatur og i et tilstrækkeligt langt tidsrum. For eksempel kan dejen fremstilles ved anvendelse af en 10 normal, direkte dejproces, en surdejsproces, en fremgangsmåde, hvor dejen hæver natten over, en lavtemperatur- og langtidsfermenteringsmetode, en frysedejsmetode, "Chorleywood Bread" processen og "Sponge Dough" processen.

15 I et yderligere aspekt angår den foreliggende opfindelse en dej. Dejen og bageriproduktet, som er fremstillet ud fra dejen, har forbedrede kvaliteter som defineret ovenfor sammenlignet med produkter, som ikke er fremstillet ifølge 20 opfindelsen. Bageriproduktet og dejen ifølge opfindelsen kan være af en hvilken som helst af de ovenfor nævnte typer, og det foretrækkes, at dejen er frisk eller frossen.

25 Enzympræparatet kan anvendes i form af et dejkonditioneringsmiddel og/eller en brødforbedrende sammensætning, som er i alt væsentligt fri for vital gluten eller lecithin. De kan fremstilles på grundlag af 30 traditionelle dejkonditioneringsmidler og/eller brødforbedrende sammensætninger, der er kendt inden for faget, ved anvendelse af procedurer, der er kendt inden for faget. Specifikke eksempler på egnede bestanddele til dejkonditioneringsmidler og/eller brødforbedrende sammensætninger er anført ovenfor.

35 Forblandingen ifølge opfindelsen kan være i alt væsentligt fri for tilsat fedt. Den kan fremstilles ved hjælp af

teknikker, der er kendt inden for faget, på grundlag af forblandingsbestanddele, der er kendt inden for faget, såsom fint mel, groft mel, dejkonditioneringsmidler, brødforbedrende additiver og lignende.

5

Følgelig angår den foreliggende beskrivelse i et yderligere vigtigt aspekt anvendelse af lipase som dejkonditioneringsmiddel og/eller brødforbedrende middel til fremstilling af dej og/eller bageriprodukter, som er i alt væsentligt fri for tilsat fedt, eller som omfatter tilsat fedt i en mængde på højst 3,5 vægt-% af dejens melbestanddel(e).

10

Når dejen indeholder tilsat fedt, foretrækkes det, at mængden af tilsat fedt udgør højst 3 vægt-% af dejens melbestanddel(e), såsom højst 2,8 eller 2,5 vægt-%, mere fortrinsvis højst 2,0 vægt-% af dejens melbestanddel(e), såsom højst 1,5 vægt-% af dejens melbestanddel(e), i særdeleshed højst 1,0 vægt-% og mest fortrinsvis højst 0,5 vægt-% af dejens melbestanddel(e).

15

20

Den foreliggende opfindelse er yderligere illustreret i følgende eksempler, som ikke på nogen måde betragtes som begrænsende for opfindelsens omfang som defineret heri.

25

Materialer og metoder

Enzymer

Lipase A: *Humicola lanuginosa*-lipasen, der er beskrevet i EP 305 216 og produceret ved rekombinant DNA-teknikker i *Aspergillus oryzae* som beskrevet i EP 305 216.

30

Lipase B-I: *Rhizomucor miehei*-lipasen, der er beskrevet af Boel et al., 1988, og produceret ved rekombinant DNA-teknikker i *A. oryzae* som beskrevet af Høge-Jensen et al., 1989, og i EP 228 023.

35

De ovennævnte lipaseenzymers aktivitetsprofiler fremgår af nedenstående tabel 1.

5 Xylanase: En xylanase produceret af *Humicola insolens*-stammen DSM 1800, som kan erhverves hos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, og som ydermere er beskrevet i EP 507 723.

10 Fungamyl: Et kommercielt α -amylasepræparat af svampeoprindelse, og som kan erhverves hos Novo Nordisk A/S.

Tabel 1

15

| Lipase | LU/g | FAU/g |
|------------|-----------|-------|
| Lipase A | 4 452 000 | <0,6 |
| Lipase B-I | 12 200 | 9 |

20

LU/g (lipaseenheder (Lipase Units)/g) og FAU/g (svampe- α -amylaseenheder (Fungal α -Amylase Units)/g) blev bestemt ved følgende analyser:

LU - lipaseenheder

25

Lipaseaktiviteten blev analyseret ved anvendelse af glycerintributyrat som substrat og gummi arabicum som emulgator. 1 LU (lipaseenhed) er den mængde enzym, som frigør 1 μ mol titrerbar smørsyre pr. minut ved 30 °C, pH 7,0. Lipaseaktiviteten blev analyseret ved hjælp af en pH-stat med anvendelse af Radiometer titrator VIT90, Radiometer, København. Yderligere enkeltheder vedrørende analysen er anført i Novo Analytical Method AF 95/5, som kan rekvireres.

30

FAU - svampe- α -amylaseenheder

1 FA-enhed (FAU) er den mængde enzym, som ved ved 37 °C og pH 4,7 nedbryder 5260 mg fast stivelse pr. time. Yderligere enkeltheder vedrørende analysen er anført i
 5 Novo Analytical Method AF 9.1/3, som kan rekvireres.

FXU - xylanaseaktivitet

Endoxylanaseaktiviteten bestemmes ved en analyse, hvor
 10 xylanaseprøven inkuberes med et remazol-xylan substrat (4-O-methyl-D-glucuron-D-xylan farvet med Remazol Brilliant Blue R, Fluka), pH 6,0. Inkubationen udføres ved 50 °C i 30 min. Baggrunden af ikke-nedbrudt farvet substrat udfældes med ethanol. Den tilbageværende blå farve i
 15 supernatanten bestemmes spektrofotometrisk ved 585 nm og er proportional med endoxylanaseaktiviteten.

Prøvens endoxylanaseaktivitet bestemmes i forhold til en enzymstandard.

20

Analysen er yderligere beskrevet i publikationen AF 293.6/1-GB, som kan rekvireres hos Novo Nordisk A/S, Danmark.

25

Brødfremstilling

I eksempel 1 (sammenlignende eksempel) blev hvidt brød fremstillet ud fra følgende grundopskrift:

30

Grundopskrift:

| | | |
|--------------------|--------|-------|
| Hvedemel | 1 kg | 100 % |
| Koldt ledningsvand | 550 ml | 55 % |
| Frisk gær | 50 g | 5 % |
| Salt | 20 g | 2 % |
| 35 Margarine | 60 g | 6 % |

Hvedemelet var af typen kaldet "Manitoba", leveret fra Valsemøllerne, Danmark, i august 1991. Gæren var traditionel gær fra De Danske Spritfabrikker (Danisco), Danmark.

5

Det kolde vand blev tilsat til en blanding af de tørre bestanddele. Den resulterende blanding blev blandet i 3 min ved 110 omdr./min og derefter i 8 min ved 260 omdr./min ved anvendelse af en spiralmixer, dvs. en Bjørn Varimixer. Den resulterende dej blev delt i 10 portioner à 350 g og fik efterfølgende lov til at hæve i 40 min ved stuetemperatur og blev derefter underkastet en 2. hævnning i et hævekammer ved 35 °C og 70 % RH i 50 min. Bagningen foregik i metalforme ved 225 °C i 30 min.

15

I eksempel 2-4 blev følgende grundopskrift og procedure anvendt:

Grundopskrift

| | | |
|----|----------------|-------|
| 20 | Mel (Manitoba) | 100 % |
| | Salt | 1,5 % |
| | Gær | 5,0 % |
| | Sukker | 1,5 % |
| | Vand | 54 % |

25

Procedure

1. Blanding af dejen (spiralmixer)

2 min ved 700 omdr./min

30 7 min ved 1.400 omdr./min

Blandetiden blev bestemt og justeret af en uddannet bager for at opnå optimal dejkonsistens under de anvendte afprøvningsbetingelser.

35 2. 1. hævnning: 30 °C - 80 % RH, 16 min.

3. Afvejning og formning.

4. Sluthævning: 32 °C - 80 % RH, 40 min.

5. Bagning: 225 °C, 20 min til boller og 30 min til brød.

5

Bedømmelse af dejen og bageriprodukterne

Dejen og bageriprodukterne beskrevet i eksempel 1 blev bedømt visuelt. Bageriprodukternes volumen blev bestemt som yderligere beskrevet i det følgende.

10

Egenskaber ved dejen og bageriprodukterne beskrevet i eksempel 2-4 blev bestemt som følger:

15 Boller, specifikt volumen: 20 bollers volumen måles ved anvendelse af den traditionelle rapsfrømetode. Det specifikke volumen udregnes som ml volumen pr. g brød. Kontrolprøvens specifikke volumen (uden enzym) defineres som 100. Det relative indeks for specifikt volumen udregnes som:

20

$$\text{indeks for specifikt vol.} = \frac{\text{specifikt volumen af 20 boller}}{\text{specifikt volumen af 20 kontrolboller}} \times 100$$

25

Brød, specifikt volumen: Middelværdien af 4 brøds volumen måles ved anvendelse af de samme metoder som beskrevet ovenfor.

30

Dejens klæbrighed og krummestrukturen bedømmes visuelt efter følgende skala:

| | | | |
|----|--------------------|-----------------|---|
| 35 | Dejens klæbrighed: | næsten flydende | 1 |
| | | for klæbrig | 2 |
| | | klæbrig | 3 |
| | | normal | 4 |

| | |
|-----|---|
| tør | 5 |
|-----|---|

| | | | |
|---|-----------------|--------------|---|
| 5 | Krummestruktur: | meget ringe | 1 |
| | | ringe | 2 |
| | | uensartet | 3 |
| | | ensartet/god | 4 |
| | | meget god | 5 |

10 Brødkrummens blødhed måles ved hjælp af en SMS-Texture Analyser. Et stempel med en diameter på 45 mm trykkes ned midt på en 20 mm tyk skive brød. Den kraft, der kræves, for at stemplet skal kunne trykke krummen 5 mm ned med en hastighed på 2,0 mm/sek., registreres og udtrykkes som krummefastheden. Jo lavere værdi, desto blødere krumme.

15 Fire skiver af hvert brød måles, og middelværdien anvendes.

Eksempler

20 EKSEMPEL 1 (sammenlignende eksempel)

Hvidt brød indeholdende 6 % tilsat fedt blev fremstillet ud fra den ovenfor beskrevne standardprocedure, og de opnåede resultater er vist i tabel 2.

25

Tabel 2

| Lipase | Lipase B-I | | |
|-------------------|----------------------------|-----|------|
| Dosering | | | |
| LU/kg mel | 10 | 100 | 1000 |
| g/100 kg | 0,1 | 1 | 10 |
| FAU/100 kg | 1 | 10 | 100 |
| Volumen* (%) | 101 | 105 | 111 |
| Blødhed* | | | |
| dag 1 | + | ++ | +++ |
| dag 2 | 0 | 0 | + |
| Virkning på dejen | Nogen blødgørende virkning | | |

* = sammenlignet med en referenceprøve uden tilsat lipase.

"0" betyder, at krummen svarer til kontrolprøvens, + betyder, at krummen er lidt blødere, ++ betyder, at krummen er blødere, og +++ betyder, at brødet er betydeligt blødere end kontrolbrødet.

Det er tydeligt, at anvendelsen af en mikrobiel lipase ved fremstillingen af dejen og bageriproduktet har en positiv virkning på dejens blødhed samt på bageriproduktets krummestruktur og volumen.

EKSEMPEL 2 (sammenlignende eksempel)

Det anvendte enzym var Lipase A, dvs. en rekombinant *H. lanuginosa*-lipase. Enzymet blev tilsat enten direkte i blandingen af bagebestanddele, eller det blev dispergeret i vand, inden det blev tilsat til blandingen. Alle afprøvninger blev udført to gange, og resultaterne var omtrent de samme. Følgende resultater blev opnået:

Tabel 3

| Lipase A | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------------|-----------------------------------|------|------|------|--------|--------|--------|------|
| LU/kg mel | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 10 000 | 20 000 | 50 000 | 0 |
| Dejens klæbrighed | Alle deje er gode at arbejde med. | | | | | | | |
| Boller, indeks spec. vol. | 119 | 124 | 122 | 122 | 113 | 111 | 103 | 100 |
| Brød, indeks spec. vol. | 111 | 112 | 118 | 112 | 111 | 108 | 104 | 100 |
| Krummestruktur | 3.5 | 3 | 3.5 | 3.5 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Blødhed, 0 t. | 349 | 314 | 244 | 318 | 334 | 403 | 411 | 595 |
| Blødhed, 24 t. | 705 | 541 | 559 | 627 | 606 | 656 | 735 | 1040 |
| Blødhed, 96 t. | 988 | 1088 | 1049 | 1252 | 1091 | 1224 | 1261 | 1754 |

Det fremgår af ovennævnte resultater, at tilsætningen af lipase øger bollernes og brødernes volumen og giver bedre krummestruktur og krummeblødhed under opbevaring. Endvidere viste lipasen sig at have en signifikant virkning på krummens hvidhed.

EKSEMPEL 3

For at bedømme hvorvidt lipasen med fordel kunne anvendes i kombination med andre enzymer, blev prøvebagninger udført med Lipase A i kombination med α -amylase. Den anvendte α -amylase var Fungamyl®.

De opnåede resultater fra anvendelsen af Lipase A i kombination med Fungamyl® er angivet i nedenstående tabel 4.

Det fremgår af tabel 4, at brød fremstillet med Lipase A i kombination med alfa-amylase har et større volumen og en bedre krummestruktur end brød fremstillet med ét af enzymerne alene. Endvidere reducerer tilsætningen af lipase dejens klæbrighed, som normalt forekommer, når en α -amylase af svampeoprindelse anvendes alene til bagningen.

Tabel 4

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Lipase A, LU/kg mel | 0 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 0 | 250 | 500 | 1000 | 1500 |
| Fungamyl, FAU/kg mel | 0 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Dejens klæbrighed | 4 | 3 | 3,5 | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Boiler indeks spec. vol. | 100 | 134 | 142 | 138 | 143 | 111 | 119 | 124 | 122 | 122 |
| Brød, indeks spec. vol. | 100 | 119 | 123 | 128 | 127 | 110 | 111 | 112 | 118 | 112 |
| Krumme- struktur | 3 | 4,5 | 4,5 | 5 | 5 | 4 | 3,5 | 3 | 3,5 | 3,5 |
| Blødhed, 0 t. | 398 | 264 | 263 | 300 | 275 | 265 | 356 | 446 | 308 | 293 |
| Blødhed, 24 t. | 1076 | 464 | 557 | 493 | 482 | 532 | 864 | 879 | 659 | 628 |
| Blødhed, 72 t. | 1727 | 1093 | 1002 | 806 | 1055 | 1241 | 1251 | 1301 | 1001 | 946 |

EKSEMPEL 4

Det er kendt, at pentosanaser såsom xylanase har en god
virkning ved bagning. Det er imidlertid også almindeligt
5 kendt, at pentosanase kan forårsage klæbrighed i dejen.
Det blev derfor afprøvet, hvorvidt lipase kunne anvendes
for at undgå eller reducere den øgede dejklæbrighed
forårsaget af pentosanasen xylanase, når den blev anvendt
alene. Nærmere bestemt blev prøvebagningerne foretaget
10 (ved anvendelse af den ovenfor anførte generelle
procedure) med Lipase A i kombination med en *H. insolens*-
xylanase. Resultaterne, der blev opnået ved anvendelse af
Lipase A i kombination med xylanasen, er anført i
nedenstående tabel 5.

15

Det fremgår af tabel 5, at klæbrigheden forårsaget af
xylanasen reduceres eller forsvinder, når dette enzym
anvendes i kombination med lipase. Endvidere giver
kombinationen af lipase med xylanase større volumen, bedre
20 krummestruktur og mindre krummeældning, end når lipase
eller xylanase anvendes alene.

Tabel 5

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-----------------------|------|-----|-----|------|------|------|------|
| Lipase A, LU/kg mel | 0 | 250 | 500 | 1000 | 1500 | 0 | 0 |
| Xylanase, FXU/kg mel | 0 | 43 | 43 | 43 | 43 | 43 | 70 |
| Dejens klæbrighed | 4 | 3.5 | 4 | 4 | 4 | 2.5 | 2.5 |
| Boller indeks sp.vol. | 100 | 136 | 143 | 134 | 140 | 120 | 127 |
| Brød, indeks sp. vol. | 100 | 116 | 122 | 119 | 119 | 108 | 118 |
| Krummestruktur | 3 | 5 | 5 | 5 | 5 | 4 | 4.5 |
| Blødhed, 0 t. | 532 | 314 | 294 | 288 | 275 | 330 | 283 |
| Blødhed, 24 t. | 1095 | 623 | 635 | 571 | 575 | 734 | 567 |
| Blødhed, 72 t. | 1843 | 918 | 893 | 950 | 966 | 1370 | 1022 |

Referencer omtalt i beskrivelsen

- 5 Bekes et al., Journal of Cereal Science 16, s. 129-140, 1992.
- Boel et al., Lipids bd. 23, nr. 7, 1988.
- 10 Bushyk et al., Carbohydrate and Lipid Complexes with Gliadin and Glutenin, i: Gluten Proteins, red. W. Bushyk, American Association of Cereal Chemists, Minneapolis, USA, 1990.
- 15 Gams, Getreide Mehl und Brot, Technologische Zeitschrift für Getreide, Mehl, Brot, Backwaren, 30. årg., nr. 5, s. 113-116, 1976.
- Huge-Jensen et al., Lipids bd. 24, nr. 9, 1989.
- 20 Weegels, P.L. og Hamer, R.J., Cereal Foods World bd. 37, nr. 5, s. 379-385, 1992.

P a t e n t k r a v:

- 5 1. Fremgangsmåde til fremstilling af en dej og/eller et
bageriprodukt fremstillet ud fra dejen, omfattende
tilsætning til dejen og/eller en hvilken som helst af
dejens bestanddele og/eller til en hvilken som helst
blandning af dejens bestanddele af
- 10 (a) en lipase afledt fra *Humicola* i en mængde svarende til
en lipaseaktivitet på 10-50 000 LU/kg mel, og
- (b) en α -amylase og/eller en xylanase.
- 15 2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, hvorved lipasen er afledt
fra *Humicola lanuginosa*.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, hvorved α -amylasen
er afledt fra *Aspergillus*, mere fortrinsvis fra *A. oryzae*.
- 20 4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-
3, hvorved xylanasen er afledt fra *Humicola*, mere
fortrinsvis fra *H. insolens*.
- 25 5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-
4, hvorved lipasen tilsættes i en mængde svarende til en
lipaseaktivitet på 10-3000 LU/kg mel, fortrinsvis 10-2500
LU/kg mel, mere fortrinsvis 10-2100 LU/kg mel, endnu mere
fortrinsvis 10-2000 LU/kg mel, og mest fortrinsvis 250-
30 2100 LU/kg mel.
6. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-
5, hvorved α -amylasen tilsættes i en mængde på 5-500
FAU/kg mel.
- 35 7. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-
6, hvorved xylanasen tilsættes i en mængde på 5-5000
FXU/kg mel.

8. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-7, hvorved dejen omfatter tilsat fedtstof i en mængde på højst 3,5 vægt-% af dejens melbestanddel(e).

5

9. Fremgangsmåde ifølge krav 8, hvorved dejen er i alt væsentligt fri for tilsat fedtstof.

10

10. Dej eller forblanding til en dej, som omfatter mel, en lipase afledt fra *Humicola* i en mængde svarende til en lipaseaktivitet på 10-50 000 LU/kg mel og en α -amylase og/eller en xylanase.

15

11. Anvendelse af et enzympræparat omfattende en lipase afledt fra *Humicola* og en α -amylase og/eller en xylanase ved en fremgangsmåde til fremstilling af en dej og/eller et bageriprodukt fremstillet ud fra dejen, hvorved lipasen tilsættes i en mængde svarende til en lipaseaktivitet på 10-50 000 LU/kg mel.

20

12. Anvendelse ifølge krav 11, hvorved lipasen er afledt fra *Humicola lanuginosa*.

25

13. Anvendelse ifølge krav 11 eller 12, hvorved α -amylasen er afledt fra *Aspergillus*, mere fortrinsvis fra *A. oryzae*.

30

14. Anvendelse ifølge et hvilket som helst af kravene 11-13, hvorved xylanasen er afledt fra *Humicola*, mere fortrinsvis fra *H. insolens*.

15. Anvendelse ifølge et hvilket som helst af kravene 11-14, hvorved enzympræparatet foreligger i form af et støvfrit granulat eller en stabiliseret væske.